

for polyphosphoric acid was allowed in the range of (180~240)°C.

(Received Jan. 12, 1976)

Keywords

High carbon ferrochromium

Kjeldahl method

Nitrogen

Polyphosphoric acid

Stannous chloride

フザレノン-X 及びその関連マイコトキシンのけい光定量

加藤 俊博, 浅部 喜博, 鈴木 政雄, 滝谷 昭司*

(1976年5月1日受理)

トリコテセン系マイコトキシンの一つであるフザレノン-X がメタノール中アミンとジルコニル塩により青色けい光を発することを見いだした。種々のアミンや金属塩を検討した結果、この反応の試薬にはエチレンジアミンと硝酸ジルコニルが適当であることが分かり、この反応を利用したフザレノン-X のけい光定量法を確立した。本法によれば、フザレノン-X (10~250) ng/0.4 ml の間でけい光強度との間に直線関係が成立した。又、ニバレノール、デヒドロキシニバレノールについて本法を適用したところ、それぞれ (10~230) ng/0.4 ml, (10~200) ng/0.4 ml の範囲で検量線が作成できた。なお T-2 トキシン, HT-2 トキシン, ネオソラニオール, トリコテシンは本法ではけい光を発しなかった。

1 緒 言

マイコトキシンは真菌類の有毒代謝産物であり、強力な発がん作用を示すものが多く、食品衛生の面で極めて強い関心が持たれている。このうち、トリコテセン系マイコトキシンは穀類に寄生する赤カビ (*Fusarium* 属菌) により産生され、その汚染穀物の摂取による中毒事件がしばしば世界各国で起きている。このマイコトキシンは他のマイコトキシンと異なり、Fig. 1 に示すように構造上微量分析に適する官能基に乏しいため、その分析は困難である。現在まで薄層クロマトグラフィー^{1)~7)}、ガスクロマトグラフィー^{8)~11)}、生物検定¹²⁾ による分析法が報告されているが、定量限界、精度、特異性、操作などの面からなお検討の余地が残されている。著者らはトリコテセン系マイコトキシンの検出、定量法を開発するため、フザレノン-X についてけい光反応を調べた。その結果、フザレノン-X がメタノール中アミンとジルコニル塩により青色けい光を発することを見いだした。そこでこの反応の試薬について検討し、この反応を利用したフザレノン-X の微量定量法を確立した。更にニバレノール、

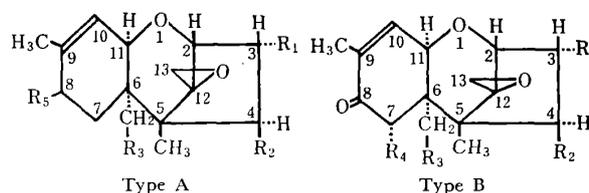


Fig. 1 Structures of some trichothecene mycotoxins

Type A	R ₁	R ₂	R ₃	R ₅
T-2 toxin	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT-2 toxin	OH	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Neosolaniol	OH	OCOCH ₃	OCOCH ₃	OH
Type B	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Fusarenon-X	OH	OCOCH ₃	OH	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
Dehydroxy-nivalenol	OH	H	OH	OH
Trichothecin	H	OCOCH=CHCH ₃	H	H

ール、デヒドロキシニバレノールに応用した結果も報告する。

2 試料, 試薬及び装置

2.1 試料・試薬

フザレノン-X 標準液: フザレノン-X 2.5mg を精ひょうし、メタノールで (10~250) ng/0.4 ml に調製する。

* 東京理科大学薬学部: 東京都新宿区市ヶ谷船河原町 12

ニバレノール標準液：ニバレノール 2.3mg を精ひょうし、メタノールで (10~230)ng/0.4 ml に調製する。

デヒドロキシニバレノール標準液：デヒドロキシニバレノール 2.0mg を精ひょうし、メタノールで (10~200)ng/0.4 ml に調製する。

3.5% (v/v) エチレンジアミン溶液：蒸留精製したエチレンジアミン 0.7 ml をメタノールに溶かして 20 ml とする。

5.0% (w/v) 硝酸ジルコニル溶液：特級品 (2 水塩) 500mg をメタノールに溶かして 10 ml とする。

メタノール：特級メタノール (関東化学)

硫酸キニーネ溶液：0.1N 硫酸で硫酸キニーネ 50 ng/ml とする。

他の試薬：アミン類は市販品を蒸留又は再結晶して精製したものを用い、金属塩は特級品をそのまま使用した。

2.2 装置

分光けい光光度計：日立分光けい光光度計 MPF-2A 型セル：容量 0.5 ml 円筒型石英マイクロセル

試験管：容量 1.5 ml 共せん試験管

3 定量操作

共せん試験管にフザレノン-X 標準液 {(10~250)ng/0.4 ml, 定量条件の検討の際は 200 ng/0.4 ml を用いた} 0.4 ml をとり、エチレンジアミン溶液 5 μ l を加え、続いて硝酸ジルコニル溶液 10 μ l を加えてよく混和する。40°C で 35 分間加熱後、室温に 10 分間放置し、励起波長 348nm, けい光波長 458nm でけい光強度を測定する。空試験は標準溶液の代わりにメタノールを用いて同様に操作する。なお、けい光強度測定の際には硫酸キニーネ溶液を用いる。

4 結果及び考察

4.1 試薬の検討

4.1.1 金属塩 多数の金属塩について、アミンの存在下フザレノン-X を用いてけい光の有無を調べた結果、ジルコニル、ジルコニウム、アルミニウム、トリウム、ベリリウムの各塩を用いた場合にけい光が見られた。次にアミンとしてエチレンジアミンを用い、等モルのこれら各塩を加えたときのけい光強度比 (硝酸ジルコニルを用いたときを 100 とする) を調べた結果を Table 1 に示す。この実験で硝酸ジルコニルを用いたときにけい光強度は最大となったので、本反応の金属塩試薬として硝酸ジルコニルを用いることにした。

4.1.2 アミン 金属塩と同様にアミン種のけい光強度 (エチレンジアミンを用いたときを 100 とする) への影響を調べた結果を Table 2 に示す。たいいていのアミンの存在でフザレノン-X は硝酸ジルコニルと反応して

Table 1 Effect of metal salt species on the fluorescence reaction

Metal salt†	Intensity ratio
Aluminum chloride	6
Aluminum nitrate	4
Zirconyl nitrate	100
Zirconyl chloride	94
Zirconyl acetate	42
Zirconium sulfate††	†††
Zirconium chloride	68
Trifluoroacetylacetone zirconium††	0
Thorium nitrate	≒0
Berillium chloride	†††

† 5 μ l of 0.19 M metal salt solution was added. †† Saturated solution; ††† Precipitation

Table 2 Effect of amine species on the fluorescence reaction

Amine†	Intensity ratio
<i>n</i> -Butylamine	††
Diethylamine	††
Triethylamine	††
Ethylenediamine	100
1,2-Propanediamine	98
1,3-Propanediamine	97
1,2-Cyclohexanediamine	84
1,3-Cyclohexanediamine	86
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl ethylenediamine	98
Aniline	31
<i>o</i> -Phenylenediamine	13
<i>p</i> -Phenylenediamine	9
Pyridine	7
Ethanolamine	40

† 5 μ l of 0.26 N amine solution was added. †† Precipitation

けい光を発するが、一般に芳香族アミンに比べ脂肪族アミンを用いたほうがけい光は強かった。又、脂肪族モノアミンではけい光を発するが白色沈殿を生ずるのに対し、脂肪族ジアミンでは沈殿は生ぜずけい光も強かった。本反応のアミン試薬としては、最も強いけい光を与えるエチレンジアミンを用いることにした。

4.1.3 溶媒 試料、試薬に対する溶解性から、本反応の溶媒としてメタノール、エタノールが使用できる。しかし溶媒に混入する水分のけい光強度に及ぼす影響を調べたところ、0.1% 程度の水の混入では影響はないが、0.3% 以上でけい光強度は減少した。従って、溶媒としてはエタノールに比べ含水率の小さい特級メタノール (標示 0.07%) を用いることにした。

4.2 定量条件の検討

4.2.1 エチレンジアミン濃度 エチレンジアミン濃度とけい光強度の関係を調べた結果を Fig. 2 に示す。エチレンジアミン濃度が (3.0~4.2)% (v/v) の範囲で

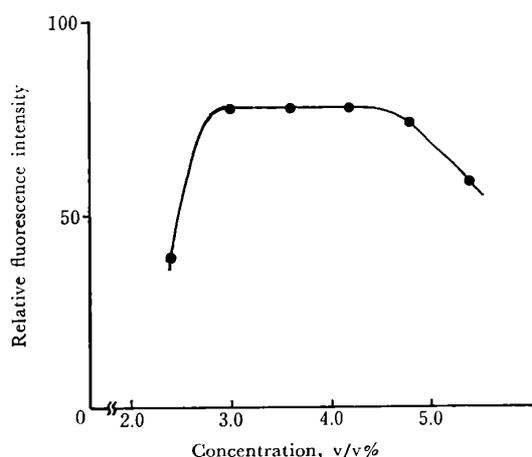


Fig. 2 Effect of ethylenediamine concentration

Fusarenon-X : 200 ng/0.4 ml; $(\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$ soln. : 5 μl ;
 $\text{ZrO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ soln. : 5.0%, 10 μl ; Temp. : 40°C;
 Time : 35 min

けい光強度は最大かつ一定となった。従って、用いるエチレンジアミン溶液の濃度は 3.5% とした。

4.2.2 硝酸ジルコニル濃度 硝酸ジルコニル濃度とけい光強度の関係を調べた結果を Fig. 3 に示す。硝酸ジルコニル濃度が (4.5~6.0)% (w/v) の範囲でけい光強度は最大かつ一定となった。従って、用いる硝酸ジルコニル溶液の濃度は 5.0% とした。

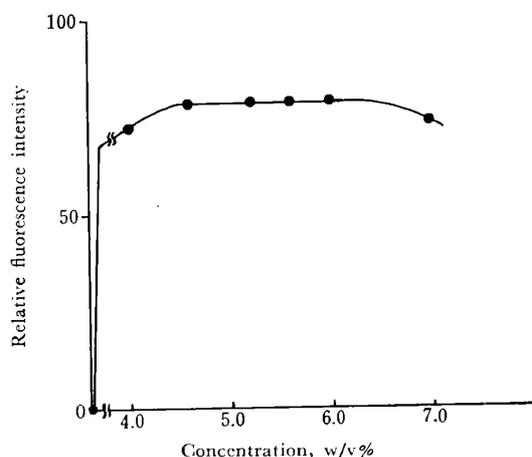


Fig. 3 Effect of zirconyl nitrate concentration

Fusarenon-X : 200 ng/0.4 ml; $(\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$ soln. : 3.5%, 5 μl ;
 $\text{ZrO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ soln. : 10 μl ; Temp. : 40°C;
 Time : 35 min

4.2.3 反応温度と反応時間 試薬添加後の反応温度を (20~50)°C とし、各温度における反応時間とけい光強度の関係を調べた結果を Fig. 4 に示す。20°C, 30°C ではけい光強度が最大に達するまで長時間を要する。又、50°C では短時間でけい光強度は最大になる

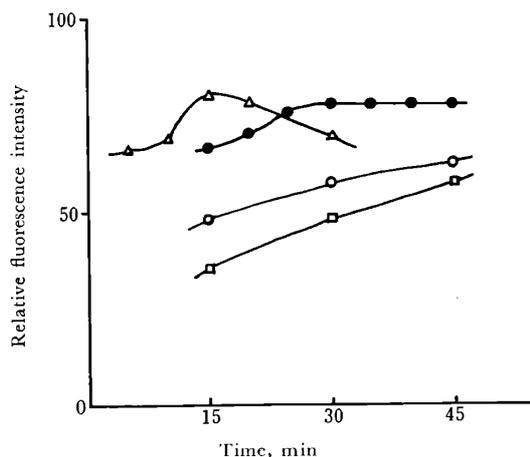


Fig. 4 Effect of reaction temperature and time

Fusarenon-X : 200 ng/0.4 ml; $(\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$ soln. : 3.5 % , 5 μl ;
 $\text{ZrO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ soln. : 5.0%, 10 μl ;
 Time : 35 min; \square — 20°C; \circ — 30°C; \bullet — 40°C; \triangle — 50°C

が、経時変化が大きい。しかし 40°C では (30~45) 分でけい光強度は最大かつ一定となったので、40°C で 35 分間反応させることを条件とした。

4.3 けい光の安定性

反応液のけい光は室温で約 2 時間安定である。

4.4 検量線

4.2 で検討した結果に基づいて定めた定量操作 (3 参照) に従ってフザレノン-X, ニバレノール, デヒドロキシニバレノールについて検量線を作成したところ、Table 3 に示す範囲内でけい光強度との間に直線関係が成立した。又、各々 2 点で測定を 10 回繰り返す、その精度を求めたところ変動係数は Table 3 のような結果となった。

Table 3 Determination range and coefficient of variation for trichothecene mycotoxins

Mycotoxin	Determination range (ng)	Coefficient of variation (%)
Fusarenon-X	10~250	{ 1.4 (245 ng/0.4 ml) 2.9 (59 ng/0.4 ml)
Nivalenol	10~230	{ 1.9 (170 ng/0.4 ml) 4.8 (28 ng/0.4 ml)
Dehydroxynivalenol	10~200	{ 1.2 (194 ng/0.4 ml) 3.5 (29 ng/0.4 ml)

4.5 他のマイコトキシン並びに関連物質の本法に対する反応

Fig. 1 に示す T-2 トキシン, HT-2 トキシン, ネオソラニオール, トリコテシンについて本法を試験したと

ころけい光は発しなかった。トリコテセン系以外のマイコトキシンではペニシリン酸が本法により青紫色のけい光を発したが、その強度は弱かった。又、フザレノン-Xと構造関連性 (β - γ -不飽和- α -ケトアルコール骨格を有する) のある化合物 (例: ヒドロキシアセトフェノン) には本法によりけい光を発するものもあるが、その強度は極めて弱い。これらの結果から本法はフザレノン-Xをはじめ、その関連マイコトキシンに対してかなりの反応選択性のあることが分かった。

5 総 括

これまで主にクロマトグラフィーを用いたトリコテセン系マイコトキシンの分析が行われてきたが、本法により液相での定量が可能となった。更に本法は操作の簡便性、定量限界、反応選択性の点から見て、今後生体、穀物試料などへの応用が期待されるので現在検討中である。又、反応機構についても検討中である。

本研究に当たり、研究費の一部は厚生省がん特別研究助成金によった。又、使用したマイコトキシンは東京理科大学薬学部上野芳夫教授により分与された。併せて深謝する。

(1976年1月, 第3回マイコトキシン研究会, 1976)
(年4月, 日本薬学会第96年会において一部発表)

文 献

- 1) P. M. Scott, J. W. Lawrence, W. van Walbeek : *Appl. Microbiol.*, **20**, 839 (1970).
- 2) 直井家寿太, 齊藤和夫, 風間栄治, 小川仁志, 木村康夫 : 東京衛研年報, **23**, 175 (1971).
- 3) Y. Ueno, N. Sato, K. Ishii, K. Sakai, H. Tsunoda, M. Enomoto : *Appl. Microbiol.*, **25**, 699 (1973).
- 4) 中野尚子, 国元武彦, 粟飯原景昭 : 食衛誌, **14**, 56 (1973).
- 5) 直井家寿太, 風間栄治, 齊藤和夫, 小川仁志, 志村公子, 木村康夫 : 東京衛研年報, **25**, 203 (1974).
- 6) F. N. Kotsonis, R. A. Ellison : *Appl. Microbiol.*, **30**, 33 (1975).
- 7) Z. Durackova, V. Betina, P. Nemeč : *J. Chromatogr.*, **116**, 141 (1976).
- 8) C. O. Ikediobi, I. C. Hsu, J. R. Bamberg, F. M. Strong : *Anal. Biochem.*, **43**, 327 (1971).
- 9) L. Stoffe : *Clin. Toxicol.*, **5**, 465 (1972).
- 10) Y. Nakahara, T. Tatsuno : *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **21**, 1267 (1973).
- 11) 田中邦幸, 天野立爾, 川田公平, 田辺弘也 : 食衛誌, **15**, 195 (1974).
- 12) Y. Ueno, N. Shimada : *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **22**, 2744 (1974).

☆

Fluorometric determination of fusarenon-X and its related mycotoxins. Toshihiro KATO, Yoshihiro ASABE, Masao SUZUKI and Shoji TAKITANI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo, 12, Ichigaya-funagawara-machi, Shinjuku-ku, Tokyo)

The fluorescence reaction of fusarenon-X with zirconyl nitrate-ethylenediamine reagent was studied in order to establish a simple and rapid micro-determining method for fusarenon-X and its related trichothecene mycotoxins. The following procedure was chosen as a standard method as the result of discussing various conditions such as the water contamination in solvent, the concentration of zirconyl nitrate and ethylenediamine, the reaction temperature and time: To a 0.4 ml of fusarenon-X standard solution in a test tube with ground stopper, 5 μ l of 3.5% (v/v)-ethylenediamine methanol solution and 10 μ l of 5.0% (w/v) zirconyl nitrate methanol solution are added and the mixture is heated at 40°C for 35 minutes. After standing for 10 minutes at room temperature, the fluorescence intensity of the mixture is measured (λ_{ex} : 348 nm, λ_{em} : 458 nm). The fluorescence product was stable for two hours at room temperature. The calibration curve showed a straight line for (10~250) ng/0.4 ml of fusarenon-X. For other trichothecene mycotoxins, nivalenol and dehydroxynivalenol could be also determined for (10~230) ng/0.4 ml, (10~200) ng/0.4 ml respectively by this method, but T-2toxin, HT-2toxin, neosolaniol and trichothecin gave no fluorescence.

(Received May 1, 1976)

Keywords

Ethylenediamine
Fluorometric determination
Fusarenon-X
Trichothecene mycotoxin
Zirconyl nitrate